



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 142 009** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 12 N 1/20//A 61 K 39/07, (C**
12 N 1/20, C 12 R 1:07)

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 97115504/13, 15.09.1997
(24) Дата начала действия патента: 15.09.1997
(46) Дата публикации: 27.11.1999
(56) Ссылки: Ветеринарные препараты:
Справочник./Под ред. Д.Ф. Осидзе, - М.:
Колос, 1981, с. 165-167.
(98) Адрес для переписки:
610024, Киров, Октябрьский пр-т, 119, НИИМ
МО РФ

(71) Заявитель:
Научно-исследовательский институт
микробиологии Министерства обороны
Российской Федерации
(72) Изобретатель: Сероглазов В.В.,
Кожухов В.В., Строчков Ю.И., Амосов М.Ю.
(73) Патентообладатель:
Научно-исследовательский институт
микробиологии Министерства обороны
Российской Федерации

(54) СПОСОБ ПОДДЕРЖАНИЯ СИБИРЕЯЗВЕННОГО ВАКЦИННОГО ШТАММА СТИ-1

(57) Реферат:
Изобретение предназначено для
производства стабильных
высококачественных вакцинных
сибиреязвенных препаратов. Микробную
популяцию пассируют через организм
восприимчивого животного, высевают
анализируемую культуру на агаровую среду с
противосибиреязвенным глобулином. Среда
позволяет выявлять токсинообразующие
клоны. Выявление клонов проводят под
контролем полноценности наиболее

иммунологически значимых детерминант rag,
lef, суа методом полимеразной цепной
реакции. Изобретение позволяет из
гетерогенных культур вакцинного штамма
СТИ-1 со сниженной иммуногенностью
получать однородные по детерминантам
токсинообразования высокоиммуногенные
культуры и предупреждать возможное
увеличение диссоциации свойств культур при
частых пересевах в неселективных условиях.
3 табл.

RU 2 142 009 C1

RU 2 142 009 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 142 009** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 1/20//A 61 K 39/07, (C
12 N 1/20, C 12 R 1:07)**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 97115504/13, 15.09.1997

(24) Effective date for property rights: 15.09.1997

(46) Date of publication: 27.11.1999

(98) Mail address:
610024, Kirov, Oktjabr'skij pr-t, 119, NIIM MO RF

(71) Applicant:
Nauchno-issledovatel'skij institut
mikrobiologii Ministerstva oborony
Rossijskoj Federatsii

(72) Inventor: Seroglazov V.V.,
Kozhukhov V.V., Stochkov Ju.I., Amosov M.Ju.

(73) Proprietor:
Nauchno-issledovatel'skij institut
mikrobiologii Ministerstva oborony
Rossijskoj Federatsii

(54) **METHOD OF MAINTENANCE OF ANTHRAX VACCINE STRAIN STI-1**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, microbiology.
SUBSTANCE: invention relates to the
production of stable vaccine antianthrax
preparations of the high quality. Microbic
population is passaged through the body of
susceptible animal, analyzed culture is sown
on an agar medium containing an antianthrax
globulin. Medium ensures to detect
toxin-forming clones. Clones are detected
under the full value control of the most

immunologically important determinants pag,
lef, cya by method of polymerase chain
reaction. Invention ensures to obtain
homogeneous and high-immunogenic cultures by
indices of toxin formation determinants from
heterogeneous cultures of the vaccine strain
STI-1 of decreased immunogenicity and to
prevent possible increase of dissociation of
properties of cultures at frequent resowing
under nonselective conditions. EFFECT:
improved method of maintenance. 3 tbl, 4 ex

RU 2 142 009 C 1

RU 2 142 009 C 1

Изобретение относится к технологии приготовления медицинских препаратов, в частности к способам поддержания сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1, обеспечивающим стабильность его биологических свойств с сохранением высокой иммуногенности, и может быть использовано в практике производства высококачественных сибиреязвенных вакцин.

Известный в микробиологической практике способ поддержания культур сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1 заключался в периодическом пересеве микробной популяции с использованием питательных сред для получения биомассы из спор. (Регламент производства живой сибиреязвенной вакцины СТИ сухой. НИИВС Тбилиси от 19 апреля 1983; Экспериментально-производственный регламент N 364-92 Вакцина сибиреязвенная, живая сухая для подкожного и скарификационного применения).

Недостатком существующего способа является отсутствие условий, позволяющих из гетерогенной популяции проводить отбор токсинообразующих клонов с полноценным набором иммунологически значимых детерминант (rag, lef, суа).

Задачей изобретения является стабилизация основных биологических свойств культуры сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1, в частности, сохранение иммуногенности.

Решение задачи достигается пассированием микробной популяции через организм восприимчивого животного с последующим высевом анализируемой культуры на среду специального состава, позволяющую выделять токсинообразующие клоны под контролем полноценности наиболее иммунологически значимых детерминант (rag, lef, суа) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Сущность предложенного способа заключается в использовании совокупности методов селекции и контроля генетической полноценности отдельных клонов из гетерогенной популяции сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1, обеспечивающих получение культуры с высокими иммунобиологическими показателями.

Возможность осуществления заявляемого изобретения показана следующими примерами.

Пример 1. Пассирование культуры сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1 через организм восприимчивого животного и его выделение.

Исходную споровую суспензию маточной культуры штамма СТИ-1 вводят тестикулярно по 0,5 мл в дозе 50...100 млн. спор по счету в камере Горяева трем морским свинкам (самцам) массой 400...450 г. На третьи сутки животных усыпляют хлороформом, вскрывают, извлекают селезенку и делают мазки отпечатки на поверхность агаровой среды с противосибиреязвенным гамма-глобулином, приготовленным по прописи, г/л:

мясо-пептонный бульон, мл - 750,0
агар, г - 25,0
калий фосфорнокислый однозамещенный трехводный, г - 1,5
глюкоза, г - 2,5
магний сернокислый семиводный, г - 1,0

марганец сернокислый пятиводный, г - 0,013

кальций хлористый шестиводный, г - 0,016

железо сернокислое семиводное, г - 0,02

урацил, г - 0,0014

аденин сульфат, г - 0,0021

тиамин гидрохлорид, г - 0,002

феноловый красный, г - 0,024

натрия бикарбонат 10% раствор, мл - 100,0

глобулин противосибиреязвенный 10% раствор, мл - 100,0

pH, ед. - 7,8 - 8,4

Нанесенное на поверхность агара содержимое селезенки последовательно распределяют шпателем на 4...5 чашек. Чашки помещают в эксикатор и инкубируют при 35...37°C в атмосфере CO₂.

На вторые сутки чашки вынимают из эксикатора и предварительно их просматривают для отбора колоний с хорошо видимой зоной преципитации. Зона преципитации может образовываться как вокруг, так и под колонией. Для более четкого проявления зон преципитации время инкубирования чашек можно продлить до 3...4 суток при комнатной температуре в атмосфере воздуха. Колонии, образующие зоны преципитации, отбирают бактериологической петлей для проведения анализа полноценности детерминант токсинообразования методом ПЦР.

Пример 2. Проведение клонового анализа культуры штамма СТИ-1, выделенной из селезенки восприимчивого животного, методом ПЦР.

Отобранную для приготовления матричной ДНК колонию ресуспендируют в 10...30 микропробирках со 100 мкл лизирующего раствора (20 mM NaOH, 100 mM трис, 2,5% додецилсульфатом натрия) и инкубируют 15 мин при 70°C, после чего смешивают с равным объемом смеси фенола и хлороформа (1:1) и центрифугируют в течение 5 мин при 15000 об/мин на микроцентрифуге "Eppendorf". Водную фазу осаждают этанолом и центрифугируют в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляют, осадок высушивают на воздухе и ресуспендируют в 10...30 мкл буфера TE (10 mM трис, 1 mM ЭДТА, pH 7,4).

Для постановки ПЦР непосредственно перед анализом готовят инкубационную смесь следующего состава (из расчета на 100 мкл реакционной смеси):

буфер для амплификации ("Бιον") - 33,3 мкл;

праймеры к исследуемому гену (см. табл 1.) - по 10 pM каждого;

ДНК-полимераза Taq - 2,5 ЕД;

смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов - до конечной концентрации 0,4 mM;

дистиллированная вода - до 100 мкл.

Инкубационную смесь для выравнивания условий ферментативного синтеза готовят одновременно для контрольной и всех анализируемых проб, тщательно перемешивают и разливают по пробиркам для амплификации в объеме 20...25 мкл. В пробирки вносят по 1 мкл исследуемого лизата, в контрольную пробирку 1 мкл стандартного образца ДНК сибиреязвенного микроба, полученного при лизисе клеток второй вакцины Ценковского. Для предотвращения испарения поверх

инкубационной смеси наносят каплю вазелинового масла и помещают пробирки в штатив программируемого термостата. ПЦР проводят в течение 30 циклов со следующими температурными режимами: плавление ДНК (15 секунд при 94°C), отжиг праймеров (15 секунд при 48°C), синтез комплементарной цепи ДНК (30... 180 секунд при 72°C, в зависимости от длины амплифицируемого участка).

По окончании процесса ферментативного синтеза ДНК пробы амплификатов вносят в 1,5% агарозный гель с бромистым этидием, помещенный в прибор для субмаринного горизонтального электрофореза.

Наличие и одинаковая, в сравнении со стандартным образцом, электрофоретическая подвижность (т.е. размеры ампликона) свидетельствуют об интактности анализируемого гена в исследуемом клоне. Большая электрофоретическая подвижность ампликона свидетельствует об его меньших размерах (делеции части гена внутри фланкирующих праймеров). Причиной отсутствия амплификации в одном из анализируемых образцов может быть полное отсутствие данного гена, делеция участка гена комплементарного одному из фланкирующих праймеров или методическая ошибка при выделении ДНК. Отсутствие ферментативного синтеза при использовании внутренних праймеров, особенно при наличии амплификации с праймерами к другим детерминантам, свидетельствует о полной утрате анализируемого гена.

Пример 3. Доказательство возможности использования метода ПЦР для анализа токсинообразующих генов (rag, lef, sua).

Из приведенных в табл.2 данных видно, что у культур, подвергшихся многократному

пересеву, накапливаются мутации, повреждающие детерминанты токсинообразования. При использовании ПЦР выявляется гетерогенность микробной популяции исследованных культур, прежде всего по наличию гена rag. Проведение культуры через организм животного уменьшает генов гетерогенность микробной популяции по признакам наличия и полноразмерности токсинообразования.

Пример 4. Доказательство возможности приготовления высокоиммуногенной культуры штамма СТИ-1.

Приготовленные по новой схеме с использованием однократного пассажа через организм морской свинки и отбора полноценных по токсинопродукции клонов методом ПЦР три серии культуры вакцинного штамма СТИ-1 отличались стабильностью детерминант токсинообразования и существенно превосходили исходную культуру 1972 г. приготовления по иммуногенности (см. табл.3).

Таким образом, данная методика позволила из культуры со сниженной иммуногенностью и высокой гетерогенностью получить высокоиммуногенные культуры и предупредить возможное увеличение диссоциации их свойств при частых перeseвах в неселективных условиях.

Формула изобретения:

Способ поддержания сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1 путем проведения пассажей, отличающийся тем, что пассирование проводят через организм восприимчивого животного с последующим высевом пассированной культуры на агаровую среду с противосибиреязвенным глобулином и контролем иммунологически значимых детерминант rag, lef, sua методом полимеразной цепной реакции.

40

45

50

55

60

Специфические праймеры, применяемые при анализе.

Тип праймера	Нуклеотидный состав	Температура отжига
Праймеры для амплификации гена <i>rag</i>		
U1787, основной	GGGGATCCAAAAAGGAGAACGTATATG	49,0°C
L4081, основной	CCGGATCCTTATCCTATCTCATAGCC	58,5°C
L2994, внутренний	TGTAGATTGGATCCGTCCTCCAGTA	55,8°C
U2378, внутренний	CAAGAGATCTGCGAAGTACAAGTGCTGG	59,4°C
U 2825, внутренний	CGTTCTTAGATCTTGGTGGGAGTGT	58,8°C
U3388, внутренний	CTGGTAGATCTGCGGATAGAGGCGGTTA	61,5°C
L2400, внутренний	GGTCTGGATCCGTCAGGTCCAGCA	60,5°C
L3702, внутренний	ACTGACGGATCCGCCCAACT	59,8°C
U2158, внутренний	GGGGTAGATCTCCAAGAAGTGATTAA	55,2°C
L2622, внутренний	GGTGTCTTGGATCCGGTGATACATTCTTA	62,1°C
Праймеры для амплификации гена <i>lef</i>		
U 785, основной	GGGAGGATCCGGGCGGTCATGGTGATGT	58,6 °C
L3020, основной	CCCAGGATCCCGTTCAGCATGGTCCGTAG	51,3°C
U1490, внутренний	ATGCACCGGAAGCTTTTAA	50,1 °C
L2267, внутренний	TCCATTTCAAACGCTCATTAT	49,5 °C
Праймеры для амплификации гена <i>суа</i>		
U 519, основной	CCACAGATCTGCAGATCAAGAACCAAAGGAG	48,5°C
L915, основной	CCACAGGATCCTCAATAATTTTTTGAAGACCT	48,1°C
U 1324, внутренний	GCCCCCGACATGTTTGAG	49,2°C
L 2249, внутренний	AACCACATCCCCCCTGTAT	48,9°C

Примечания: 1. Нуклеотидная последовательность приведена от 3' – к 5' – концу ДНК; 2. L-нижний праймер; 3. U-верхний праймер.

Влияние пассирования в неселективных условиях
на детерминанты токсинообразования

Штамм, год приготовления	Пассаж через животное	Количество пересевов на ИПС	Процент дефектных клонов		
			rag	lef	суа
СТИ-1, 1972	не проводили	0	10	10	10
	не проводили	10	20	30	30
СТИ-1, 1994	однократный	0	0	0	0
	однократный	10	10	10	10

Таблица 3

Характеристика культуры штамма СТИ-1

Штамм, серия, год приготовления	Количество спор в процентах		Содержание клонов с утратой или делециями в гене rag в процентах	Индекс иммунитета, усл.ед.
	по МК	окрашенных по Циллю-Нильсену		
СТИ-1, 1972	98	90	10	$2,2 \cdot 10^3$
СТИ-1, серия 1, 1994	96	94	0	$5,0 \cdot 10^5$
СТИ-1, серия 2, 1994	95	92	0	$5,0 \cdot 10^5$
СТИ-1, серия 3, 1994	98	96	0	$2,5 \cdot 10^5$

Примечание. МК - количество жизнеспособных спор, определяемое методом подсчета в микрокультуре.